

Validación de la técnica para la cuantificación de tilosina en un producto sólido

Validation of technique for the quantification of tylosin in a solid product

Luz Stella Mejía Rangel^I, Viviana Peña Paez^{II}, Janeth Arias Palacios^{III}

^I Microbióloga Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

^{II} Microbióloga Industrial. Coordinadora del Departamento de Microbiología. Control de Calidad. Vicar Farmacéutica S.A. Bogota D.C. Colombia.

^{III} Bacterióloga. Máster en Ciencias. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Universidad Javeriana Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Se validó la técnica para la cuantificación de tilosina en polvo, para lo cual previamente se estandarizó la técnica recomendada por la United States Pharmacopeia versión 30 del 2007, con el fin de ajustarse y dar cumplimiento a la normativa internacional. La muestra se compuso del 10 % de tilosina fosfato y 90 % de Carrier 40-60. El microorganismo sometido a prueba fue *Micrococcus luteus* ATCC 9341 y se empleó el método de difusión en agar. Los resultados de las pruebas se sometieron al programa de validación microbiológica "Validation Manager". El método de difusión en agar cumplió con los valores esperados, y así quedó validada la técnica.

Palabras clave: tilosina, validación, *Micrococcus luteus*, difusión en agar.

ABSTRACT

The quantification technique of powdered tylosin was validated. To this end, the technique recommended by the United States Pharmacopeia, 30th version, 2007 was standardized to adapt it to and to comply with the international regulations. The sample was composed of 10 % tylosin phosphate and 90 % Carrier 40-60. The agar diffusion was used to test the micro-organism *Micrococcus luteus* ATCC 9341

and all results were microbiologically validated by the program "Validation Manager". The agar diffusion method met the prospective values, thus validating the technique.

Key words: tylosin, validation, *Micrococcus luteus*, Agar diffusion.

INTRODUCCIÓN

La validación consiste en demostrar con un alto grado de confianza por medio de evidencia documentada, que un proceso específico producirá de forma consistente y permanente productos que poseerán las características de calidad predefinidas.¹

Los estudios de validación forman parte esencial de las buenas prácticas de fabricación y deben efectuarse conforme a protocolos definidos de antemano.² En estos se debe preparar un informe escrito que resuma los resultados y las conclusiones logradas. A su vez en este tipo de estudios deben establecerse procesos y procedimientos, los cuales periódicamente se someterán a una revalidación, con el fin de seguir obteniendo los resultados deseados.

El propósito del presente estudio fue la validación microbiológica de la técnica para la cuantificación de tilosina en polvo, la cual es de gran importancia en la industria pecuaria.³ De esta manera se busca asegurar la calidad del producto, de tal forma que ayude a contribuir al mejoramiento de la calidad de vida animal.

MÉTODOS

Se realizó una validación de tipo concurrente. En la validación de la metodología de la técnica para la cuantificación de tilosina, se evaluaron los parámetros de especificidad, selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación. Los resultados se analizaron inicialmente en Excel y posteriormente mediante el programa estadístico "Validation Manager".

Microorganismo y solución amortiguadora

El microorganismo en el presente estudio fue *Micrococcus luteus*, el cual se obtuvo de las colecciones estandarizadas de la American Type Culture Collection (ATCC 9341). Se usó una solución amortiguadora 3 N y pH 8.

Medio de cultivo

El medio base de cultivo se compuso de medio antibiótico No. 11.⁴ Se agregó 20 mL de este a cada caja de Petri, y se dejó solidificar por 40 min.

Inoculo

Se preparó una suspensión en solución salina al 0,9 % de *Micrococcus luteus*, hasta obtener una turbidez igual al patrón de McFarland al 25 % de transmitancia. Posteriormente por cada 100 mL de medio antibiótico No. 11 se adicionó 3 mL de la suspensión del microorganismo. A partir de esta se tomaron 6 mL, los cuales se inocularon al medio base, como capa de siembra. El inoculo se dejó solidificar por 1 h.

Muestra de trabajo y estándar

Como Estándar se utilizó tilosina fosfato, lote No. E067067, con una potencia de 901,8 UI/mg. La muestra de trabajo usada fue tilosina en polvo al 10 % de concentración (lote No. TF0H0072P) como principio activo.

Perforación y lectura

Se realizaron 6 perforaciones equidistantes entre ellas en el agar ya inoculado. Posteriormente se rotularon tres pozos como muestra de trabajo y los restantes como estándar. La siembra se realizó enfrentando la concentración central de trabajo contra la muestra estándar, agregando en cada pozo 100 µL respectivamente. Las cajas se incubaron a 37 °C por 18 ± 2 h y después de transcurrido el tiempo se procedió a la lectura de los halos de inhibición.

Especificidad

Se prepararon muestras al 100 % del estándar, muestra y diluyente. Se seleccionó 1,6 UI/mL como concentración central de trabajo.

Linealidad

Para evaluar la linealidad del sistema se realizaron diluciones a partir del estándar, obteniéndose 8 niveles de concentraciones diferentes que van desde 0,6 hasta 2,8 UI/mL (0,6; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 2,0; 2,4 y 2,8 UI/mL), con el fin de determinar la concentración de trabajo.

En la linealidad del método, se realizaron diluciones a partir del estándar, pero se le adicionó 1 mL de placebo antes de aforar la última dilución de cada concentración.

Selectividad

Para verificar la selectividad del método analítico se prepararon muestras al 100 % del estándar, la muestra y a su vez se realizó el análisis al excipiente "carrier", con el fin de detectar posibles interferencias, por lo cual se sometieron a las siguientes condiciones:

Acidez: 5 mL de HCl 1 N en baño termostataado por 1 h a 60 °C.

Basicidad: 5 mL de NaOH 1N en baño termostataado por 1 h a 60 °C.

Fotólisis por UV: luz solar por una semana.

Temperatura: en baño termostataado a 60 °C por 1 h.

Precisión

La evaluación de la precisión del método, se realizó por 2 analistas en 2 días diferentes usando la misma muestra.

Para la evaluación de la precisión del sistema, se tomaron 10 datos de la concentración central del parámetro linealidad del sistema y se sometieron al tratamiento estadístico mediante el programa "Validation Manager".

Exactitud

Para verificar la exactitud del método, se prepararon soluciones a diferentes concentraciones (80, 100 y 120 %) a partir del estándar adicionando 1 mL de placebo a la última dilución, con el fin de verificar el porcentaje de recuperación el cual se encuentra entre 97-103 %.

Limite de detección

Para evaluar el límite de detección, se realizaron diluciones hasta obtener una concentración de 0,6 UI/mL, la cual se enfrentó al estándar que tenía una concentración de 1,6 UI/mL.

Limites de cuantificación

Se enfrentaron la muestra y el estándar, los cuales poseían una concentración de 0,8 y 1,6 UI/mL respectivamente. Esta prueba se realizó con el objeto de evaluar la confiabilidad y exactitud en el valor.

RESULTADOS

Especificidad

En la muestra de trabajo se obtuvo una concentración de 10,6/100 g, en el placebo y en el caso del diluyente no hubo presencia de halo de inhibición.

Selectividad

En condición ácida el estándar tuvo un porcentaje de degradación de 32,4 % en cambio la muestra obtuvo un 44,2 %. Bajo condiciones de basicidad, el Estándar presentó un 96,1 % de degradación frente a la muestra que presentó un 95,9 %. En condiciones térmicas el estándar presentó una degradación del 38,9 % comparado con el 52 % obtenido por la muestra; bajo radiaciones ultravioleta, el porcentaje de degradación del Estándar fue del 7 % y el de la muestra de 14,5 %.

Linealidad

En la linealidad del sistema la ecuación obtenido fue $y = 0,0941x - 1,2096$ con un $R^2 = 0,996$. Para la linealidad del método, se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 0,121x - 1,5818$ con un $R^2 = 0,9577$.

Precisión

Para el día y el analista 1, se tuvo un porcentaje promedio de 105,3; en el día 1 y analista 2, el porcentaje promedio conseguido fue de 100,1. Para el analista 1 en el segundo día, se obtuvo un porcentaje promedio de 96,6, y para el analista 2 el porcentaje promedio fue de 100,4.

Exactitud

Al 80, 100 y 120 % de concentración, el porcentaje de recuperación obtenido fue de 102,1, 98,7 y 101,7, respectivamente.

Limite de detección

Se observó halo de inhibición a partir de 0,6 UI/mL, del estándar.

Limite de cuantificación

El límite de cuantificación es de 0,8 UI/mg, concentración en la cual se obtuvo un porcentaje de recuperación de 103,1 y 105,9.

DISCUSIÓN

Se puede observar en el parámetro de especificidad que la técnica evaluada permite encontrar respuesta en la muestra de trabajo, y a su vez se pudo verificar que tanto el placebo como el diluyente no afectan la respuesta de la tilosina, ya que no hubo presencia de halo de inhibición en estos.

En la evaluación del parámetro de selectividad, cuando la muestra y el estándar se sometieron a radiaciones UV, temperaturas altas, condiciones ácidas y básicas, se observó que el principio activo (tilosina) es susceptible a este tipo de condiciones. En cambio el placebo que se sometió a estas mismas condiciones no se vio afectado, por lo que era de esperarse no presentó halo de inhibición. Estos resultados indican que el producto debe almacenarse de manera adecuada, de tal forma que esté lejos de los rayos solares y de cualquier tipo de sustancia que altere su pH, ya que en condiciones de basicidad supera el 95 % de degradación.

En la linealidad del sistema del principio activo (tilosina fosfato), la ecuación de la recta obtenida es la curva patrón para la evaluación de los parámetros de validación. En la linealidad del método de tilosina comparado con el estándar, se encontró una respuesta lineal ya que hay proporcionalidad entre la concentración de trabajo y la respuesta del halo. En ambas evaluaciones de linealidad los valores son aceptables ya que presentaron r^2 mayores que 0,95.

Para la precisión del método se pudo apreciar que el analista 1 y 2 en los 2 días evaluados, presentaron un coeficiente de variación de repetitividad de 3,98 y un coeficiente de variación de precisión de 4,81, con una especificación máxima de 5. Lo anterior indica que el método cumple con los parámetros de repetitividad (precisión del procedimiento cuando es repetido por el mismo analista bajo el mismo conjunto de condiciones, los mismos reactivos, equipos, graduaciones y laboratorio, dentro de un lapso breve) y reproducibilidad.

En el parámetro de exactitud, el porcentaje de recuperación al 80, 100 y 120 % de concentración del estándar fue cercano al 100 %, esto indica que la técnica es exacta, con valores reales al momento de trabajar.

El límite de detección se determinó de forma experimental, este comenzó desde 0,6 UI/mL de concentración, pues ésta fue la mínima concentración en la cual se observaron halos de inhibición. El límite de cuantificación para la tilosina fue de 0,8 UI/mL, confirmando así que la concentración es exacta y cuantificable, porque mostró resultados coherentes y valores que pueden someterse al análisis estadístico.

Por lo anterior se puede concluir que el método de difusión en placa, mediante la técnica de potencia funciona para la validación de la técnica de cuantificación de tilosina, en productos cuya forma farmacéutica sea en polvo. De manera adjunta se observó que los parámetros críticos para la validación microbiológica de la técnica son la selectividad y la precisión.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. WHO. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Report 32. Geneva: WHO Press; 1992. Available from: http://libdoc.who.int/trs/WHO_TRS_823.pdf
2. WHO. Quality assurance of pharmaceuticals. Good manufacturing practices and inspection. Vol. 2. Geneva: WHO Press; 1999.
3. Adams Richard H. Farmacología y terapéutica veterinaria. 2ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 2003. p. 937-43.
4. United States Pharmacopoeial Convention. USP XXX. United States Pharmacopoeia Convention. The official compendia of standards. 30 ed. Rockville: Mack Printing; 2007.

Recibido: 15 de febrero de 2011.

Aprobado: 8 de abril de 2011.

Luz Stella Mejía Rangel. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera 7 No. 40-62, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: vivianap78@netscape.net; jdcarias@javeriana.edu.co